

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT  
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et  
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

TONNELIER, Jean-Claude  
Nony & Associés  
3 rue de Penthievre  
F-75008 Paris  
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 avril 2001 (19.04.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire DC/BR70208	
Demande internationale no PCT/FR00/01728	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> le déposant	<input type="checkbox"/> l'inventeur	<input checked="" type="checkbox"/> le mandataire
<input type="checkbox"/> le représentant commun		
Nom et adresse TONNELIER, Jean-Claude Nony & Associés 29, rue Cambacérès F-75008 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 43 12 84 60	
	no de télécopieur 01 43 12 84 70	
	no de téléimprimeur	
2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:		
<input type="checkbox"/> la personne	<input type="checkbox"/> le nom	<input checked="" type="checkbox"/> l'adresse
<input type="checkbox"/> la nationalité		
<input type="checkbox"/> le domicile		
Nom et adresse TONNELIER, Jean-Claude Nony & Associés 3 rue de Penthievre F-75008 Paris FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat)	Domicile (nom de l'Etat)
	no de téléphone 01 43 12 84 60	
	no de télécopieur 01 43 12 84 70	
	no de téléimprimeur	
3. Observations complémentaires, le cas échéant:		
4. Une copie de cette notification a été envoyée:		
<input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur	<input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés	
<input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale	<input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés	
<input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international	<input type="checkbox"/> autre destinataire:	

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Sean Taylor
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 avril 2001 (19.04.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01728	Référence du dossier du déposant ou du mandataire DC/BR70208
Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 juin 2000 (21.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 21 juin 1999 (21.06.99)
Déposant TELLES, Jean-Noël etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

05 janvier 2001 (05.01.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI  
 34, chemin des Colombettes  
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Sean Taylor

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
28 décembre 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 00/78990 A2

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup>: C12Q (74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Nony & Associés, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01728 (81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) Date de dépôt international: 21 juin 2000 (21.06.2000)
- (25) Langue de dépôt: français
- (26) Langue de publication: français
- (30) Données relatives à la priorité: 99/07855 21 juin 1999 (21.06.1999) FR (84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*): BIO MERIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS [FR/FR]; 3, avenue Victoria, F-75004 Paris (FR).
- (72) Inventeurs; et
- (75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): TELLES, Jean-Noël [FR/FR]; 33, rue Dautancourt, F-75017 Paris (FR). BRUN-VEZINET, Françoise [FR/FR]; 24, boulevard St Germain, F-75005 Paris (FR). DESCAMPS, Diane [FR/FR]; 85, boulevard Pasteur, F-75015 Paris (FR).

**Publiée:**

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: SEARCH METHOD FOR RESISTANCE TO ANTI-PROTEASES OF A STRAIN OF THE HIV 2 VIRUS FROM A BIOLOGICAL SAMPLE TAKEN FROM A PATIENT

(54) Titre: PROCÉDE DE RECHERCHE D'UNE RESISTANCE AUX ANTI-PROTEASES D'UNE SOUCHE DU VIRUS VIH-2 PROVENANT D'UN ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE PRÉLEVÉ CHEZ UN PATIENT

(57) Abstract: A search method in a biological sample containing an HIV 2 viral strain for possible resistance of said strain to treatment by an anti-protease agent, and nucleotide probes for the implementation thereof. According to methods known per se, the presence of at least one mutation at certain, specified, particular positions of the proteinic sequence of the protease of said viral strain from a biological sample taken from a patient contaminated by HIV 2 is searched. If said mutation is observed, the existence of a resistance to said anti-protease agent is assumed in the patient.

(57) Abrégé: Procédé de recherche, dans un échantillon biologique contenant une souche virale VIH-2 d'une résistance éventuelle de ladite souche virale à un traitement par un agent anti-protéase, et sondes nucléotidiques pour sa mise en oeuvre. On recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation à certaines positions particulières spécifiées de la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale provenant d'un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2. Dans le cas où l'existence d'une telle mutation est observée, on conclut à l'existence d'une résistance audit agent anti-protéase chez le patient considéré.

WO 00/78990 A2

Procédé de recherche d'une résistance aux anti-protéases d'une souche du virus VIH-2  
provenant d'un échantillon biologique prélevé chez un patient

L'invention concerne un procédé de recherche d'une résistance du virus VIH-2 à un traitement par une anti-protéase, chez un patient contaminé par le VIH-2,  
5 ainsi que des sondes nucléotidiques utilisables dans une telle recherche.

Deux virus sont la cause du syndrome d'immunodéficience acquise (sida) : VIH-1 et VIH-2. VIH-1 est présent dans le monde entier alors que VIH-2 est présent principalement en Afrique de l'Ouest.

Des traitements antiviraux efficaces sont largement utilisés depuis 1996  
10 dans les pays développés où le virus présent est VIH-1. Le coût de ces traitements ne permet pas leur utilisation dans les pays en voie de développement où le VIH-2 est présent.

Les traitements anti-rétroviraux sont répartis en 3 classes : anti-protéase (Indinavir, Ritonavir, Saquinavir, Nelfinavir et Amprenavir), inhibiteurs nucléosidique,  
15 de transcriptase inverse, dite RT (Zidovudine, Didanosine, Zalcitabine, Lamivudine, Stavudine, Abacavir, FTC et Adefovir) et inhibiteurs non nucléosidiques de RT (Nevirapine, Delavirdine et Efavirenz). Ces traitements sont souvent effectués conjointement ; on parle alors de multithérapies.

Les anti-protéases induisent des mutations primaires qui confèrent un degré  
20 élevé de résistance mais altèrent la capacité de répllication du virus. Il est nécessaire pour le virus de sélectionner des mutations secondaires pour être à la fois résistant et capable de se répliquer activement. Par ailleurs, des mutations de la transcriptase inverse ont été décrites dans le cas d'utilisation conjointe d'inhibiteurs nucléosidique de la RT.

25 Pendant le traitement de l'infection à VIH-1, notamment si la concentration circulante des agents traitants est insuffisante, la répllication virale n'est pas suffisamment inhibée ou remonte au-dessus du seuil de détection des techniques de charge virale disponibles (la "charge virale" est la mesure de la quantité des génomes de virus circulants). Du fait du taux d'erreur élevé de la transcription inverse, cela se  
30 traduit par l'apparition de mutations dans les gènes qui sont la cible des traitements : la protéase et la transcriptase inverse. Certaines mutations entraînent l'apparition de résistances, à des degrés divers, aux antiviraux. On aboutit à des situations d'échec

virologique chez 20 à 40 % des patients traités par les multithérapies mises en pratique actuellement.

La mise en évidence de virus résistants à une ou plusieurs molécules chez un patient avant traitement ou lors d'une réaugmentation de la charge virale permet de  
5 choisir la meilleure association de molécules pour traiter le VIH-1.

Il n'y a pas actuellement de données publiées concernant la présence de mutations dans le génome du VIH-2, dues à l'utilisation d'anti-protéases.

Les traitements par les agents anti-protéases, actifs pour VIH-1, le sont aussi pour VIH-2. Cependant, aucune méthode n'est disponible pour aider le clinicien à  
10 déterminer la résistance aux traitements par anti-protéases chez les patients contaminés par le VIH-2.

La séquence d'acides aminés de la protéase de VIH-2 est connue. Dans la présente demande, la numérotation des acides aminés de cette séquence peut être déduite de celle décrite dans Human Retroviruses and Aids, 1997, Los Alamos National  
15 Laboratory, Los Alamos, New Mexico, Chapitre II, pp. B10 et B11. Le premier acide aminé de la séquence de la protéase, qui est considéré comme la position 1 dans la présente demande, est la proline en position 86 de la polyprotéine PoL de la souche ROD.

On a maintenant découvert que les traitements aux anti-protéases sont  
20 susceptibles de faire apparaître des mutations aux positions 45, 54, 64, 84 et 90, ainsi qu'aux positions 10, 46 de la protéase de VIH-2, et que les souches virales mutées ainsi apparues sont généralement résistantes à l'un au moins des agents anti-protéases utilisés.

L'objet de la présente invention est donc un procédé de recherche d'une résistance éventuelle d'une souche virale VIH-2 à un traitement par un agent anti-  
25 protéase.

Dans une phase préliminaire de recherche, il s'agit d'un procédé dans lequel :

a) on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation à l'une des positions 45, 54, 64, 84 et 90 ou à l'une des positions 10, 46 de la  
30 séquence protéique de la protéase de ladite souche virale provenant d'un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2,

b) on sélectionne, parmi les mutations trouvées en a), celles qui, après clonage dans un virus VIH-2, n'empêchent pas le clone viral obtenu de se multiplier en culture en présence dudit agent anti-protéase, et

5 c) dans le cas où au moins une mutation est sélectionnée à l'étape b), on conclut à l'existence d'une résistance audit agent anti-protéase mentionné en b).

On sélectionne, parmi les mutations trouvées en a), celles qui, lorsqu'elles sont présentes dans un gène cloné dans un virus VIH-2, confèrent au clone viral la propriété de ne pas être affecté significativement dans sa capacité à se multiplier en présence dudit agent anti-protéase. Pour mettre en œuvre l'étape b), on peut opérer  
10 comme indiqué ci-après. Les mutations à tester sont introduites individuellement dans un clone de virus par mutagénèse dirigée selon la méthode décrite dans l'article de Kemp et al, J. Virol., 72(6), p 5093-5098, 1998. Les clones ainsi obtenus sont mis en culture avec comme référence un clone sauvage de virus, c'est-à-dire non muté, en présence des différentes drogues anti-protéases susceptibles d'agir contre le virus  
15 VIH-2. Une mesure du  $CI_{50}$ , par exemple avec un test colorimétrique (voir publication de Kemp citée ci-dessus), permet de déterminer l'importance de la mutation (mineure ou majeure) vis-à-vis des différentes drogues testées. On peut ainsi sélectionner les mutations qui permettent au virus de se multiplier en présence d'un agent anti-protéase, ces mutations donnant naissance à des souches résistantes à cet anti-protéase.

20 Bien entendu, dans le cas prévu en c), on doit envisager le traitement du patient, dans le futur, avec un agent anti-protéase différent de celui pour lequel l'existence d'une résistance a été ainsi révélée chez le patient considéré.

Dans le cas où l'étape b) n'a pas permis de sélectionner une mutation trouvée à l'étape a), on peut conclure que la mutation considérée n'a pas induit une résistance du  
25 virus VIH-2 à l'agent anti-protéase testé, chez le patient considéré.

Il est évident que, lorsque l'étape b) a permis d'identifier une mutation qui engendre une résistance à un agent anti-protéase donné, il n'y a pas lieu de mettre en œuvre ultérieurement l'étape b) du procédé décrit ci-dessus. Dans ce cas, l'étape a) suffit  
30 puisque, le lien entre la mutation et la résistance à l'agent anti-protéase ayant été établi, une fois pour toutes, il est possible de passer directement à l'étape c) et de conclure à l'existence d'une résistance à l'agent anti-protéase étudié.

L'invention concerne notamment un procédé de recherche d'une résistance éventuelle d'une souche virale VIH-2 à un traitement par un agent anti-protéase, dans lequel on recherche la présence d'au moins une mutation choisie parmi les mutations suivantes :

5 K 45 R, I 54 M, I 64 V, I 84 L et L 90 M, ou bien encore V 10 I, I 46 V  
et I 82 M,

dans la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, et dans lequel on conclut à l'existence de ladite résistance en cas de présence de ladite mutation ou desdites mutations.

10 La représentation conventionnelle utilisée dans la présente demande pour  
décrire une mutation est la suivante : le nombre indique la position sur la séquence  
d'acides aminés de la protéase de VIH-2. La lettre située à gauche du nombre indique  
l'acide aminé de la souche sauvage selon la classification internationale, avec le code à  
une lettre. La lettre située à droite du nombre indique l'acide aminé, selon la même  
15 classification, qui résulte de l'apparition d'une mutation.

Par "souche" sauvage, l'on entend une souche de virus n'ayant pas muté suite à un traitement avec une anti-protéase.

Pour rechercher une mutation de la séquence protéique de la protéase de la souche virale considérée, on opère de préférence en recherchant une mutation correspondante sur la séquence nucléotidique du gène de ladite protéase. La recherche de ces mutations peut se faire sur l'ADN ou l'ARN. Bien entendu, dans cette recherche d'une mutation dans la séquence protéique par recherche de mutation dans la séquence nucléotidique, on tiendra compte de la dégénérescence du code génétique, à savoir qu'un même acide aminé peut être codé par des codons différents. On peut effectuer cette recherche de mutation dans la séquence nucléotique selon les méthodes connues, en particulier par les techniques d'hybridation ou de séquençage.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, une méthode d'hybridation à l'aide de sondes spécifiques est mise en œuvre pour la recherche de la ou des mutation(s).

30 Un mode d'exécution particulier utilisant une méthode d'hybridation consiste à obtenir un polynucléotide contenant tout ou partie du gène de la protéase, et comprenant la séquence d'intérêt correspondant à la région contenant la mutation à

rechercher. Un tel polynucléotide peut être obtenu notamment par amplification enzymatique. La méthode utilisée comprend alors les étapes consistant à mettre en contact ledit polynucléotide avec une sonde nucléotidique, fixée ou susceptible de se fixer sur un support solide, et capable de s'hybrider spécifiquement avec un tel  
5 polynucléotide uniquement dans le cas où le polynucléotide comporte la mutation étudiée ; puis à révéler, selon les méthodes connues, la présence éventuelle du polynucléotide, fixé au support solide notamment par l'intermédiaire de la sonde de capture. Pour cela, on peut soumettre le support solide à une étape de lavage, après quoi on révèle la présence du polynucléotide, à l'état fixé sur le support, soit par une méthode  
10 physique, soit à l'aide d'un marqueur approprié.

La fixation de la sonde peut être réalisée directement par adsorption ou par covalence. La fixation peut aussi être réalisée indirectement par l'intermédiaire d'une réaction du type ligand/antiligand comme le couple biotine/streptavidine ou haptène/anticorps, l'antiligand étant fixé par exemple sur le support solide et le ligand  
15 étant fixé sur la sonde.

Le polynucléotide peut aussi être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléoside triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans  
20 les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA.

Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO 91/19812.

25 Un mode particulier de marquage de polynucléotides est décrit dans la demande FR 98 07870 de la demanderesse.

En variante, on peut préparer le polynucléotide comprenant tout ou partie du gène de la protéase par amplification enzymatique, en procédant par élongation d'amorces comportant un ligand. Le polynucléotide obtenu, qui comporte donc le  
30 ligand, peut être fixé sur le support solide par interaction avec un antiligand correspondant. On met ensuite en contact le support solide, sur lequel est fixé le polynucléotide, avec au moins une sonde capable de se fixer sur le polynucléotide de



façon spécifique, uniquement s'il contient la mutation étudiée ou recherchée. Dans le cas où cette mutation est présente, la sonde se trouve fixée au support solide par l'intermédiaire de l'hybride qu'elle forme avec le polynucléotide lui-même fixé. Il reste alors à révéler la présence de l'hybride ainsi formé, selon les méthodes connues.

- 5 Dans un autre mode d'exécution, on utilise une méthode d'hybridation comprenant les étapes consistant à amplifier enzymatiquement tout ou partie du gène de la protéase à l'aide d'amorces portant un ligand pour générer un polynucléotide comportant au moins un ligand, à fixer le polynucléotide sur un support solide par interaction avec un antiligand comme décrit précédemment, à mettre en contact ledit
- 10 polynucléotide fixé avec au moins une sonde capable de s'hybrider spécifiquement avec celui-ci, et à révéler l'hybride éventuellement formé. La sonde ne doit s'hybrider que si le polynucléotide contient la mutation recherchée.

- D'autres méthodes de détection par hybridation sont envisageables comme décrit dans Kricka et al., *Clinical Chemistry*, 45(4), pp. 453-458, 1999, ou Keller G.H.
- 15 et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, pp. 173-249.

- Le terme "support solide" tel qu'utilisé ici inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un polynucléotide. Des matériaux de synthèse, ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement, peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de
- 20 cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de cellulose et la nitrocellulose, ou le dextran ; des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques,
- 25 des gels, etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO 9412670, d'une particule ou d'une biopuce.

Par "biopuce", on entend un support solide de dimension réduite où sont fixés une multitude de polynucléotides à des positions prédéterminées.

- 30 Des exemples de ces biopuces sont donnés par exemple dans les publications de G. Ramsay. *Nature Biotechnology*, 16, pp. 40-44, 1998 ; F. Ginot, *Human Mutation*, 10, pp. 1-10, 1997 ; J. Cheng et al. *Molecular diagnosis*, 1(3),

p. 183-200, 1996 ; T. Livache et al, Nucleic Acids Research, 22(15), pp. 2915-2921, 1994 ; J. Cheng et al, Nature Biotechnology, 16, pp. 541-546, 1998. La propriété principale du support solide doit être de conserver les caractéristiques d'hybridation des sondes sur la cible et de permettre un bruit de fond minimum pour la méthode de  
5 détection. Un avantage des biopuces est qu'elles simplifient l'utilisation de nombreuses sondes tenant compte du polymorphisme du virus dans les zones voisines de la mutation à rechercher. Une biopuce permettant de vérifier la présence ou l'absence de mutations peut être réalisée en suivant la procédure décrite par Kozal M. et al. Nature Medicine, 2, pp. 753-759, 1996, en fonction des alignements des séquences connues pour les  
10 différentes souches du VIH-2.

Par "marqueur", on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la bêtagalactosidase, la glucose-6-  
15 phosphate déshydrogénase ; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance  
20 plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ .

Des systèmes d'amplification du signal peuvent être utilisés comme décrit dans le document WO/95 08000 et dans ce cas, la réaction préliminaire d'amplification  
25 enzymatique peut ne pas être nécessaire.

Le terme "amorce" désigne une séquence oligonucléotidique capable de s'hybrider à une séquence nucléique d'intérêt et de servir de point de départ à une réaction d'élongation enzymatique pour produire un fragment d'acide nucléique complémentaire d'une cible d'intérêt, comme le gène de la protéase ou une partie de ce  
30 gène. L'amorce a une taille comprise par exemple entre 5 et 50 nucléotides, en particulier entre 10 et 30 nucléotides. De préférence, les amorces seront choisies dans des régions conservées du virus VIH-2 pour permettre l'amplification de toutes les

souches du virus susceptibles d'être rencontrées chez un patient, et donc de faire face au polymorphisme inhérent au virus VIH-2.

Les sondes permettant de mettre en évidence une mutation sur les positions 45 et/ou 54 et/ou 64 et/ou 84 et/ou 90, ainsi que celles permettant de mettre en évidence  
5 une mutation sur les positions 10 et/ou 46 en s'hybridant sur tout ou partie du gène de la protéase du virus VIH-2 présent dans un échantillon biologique, sont aussi un objet de la présente invention.

Le terme "sonde" fait référence à une séquence oligonucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement à une séquence nucléique d'intérêt. En l'occurrence, le but  
10 de la présente invention étant de discriminer une mutation ponctuelle sur le gène de la protéase du VIH-2, la sonde doit permettre, dans les conditions d'hybridation ou de lavage prédéterminées, de différencier une mutation ponctuelle. La taille de ces sondes est comprise entre 5 et 40 nucléotides, et notamment entre 9 et 25 nucléotides. Des méthodes de détermination de ces sondes sont décrites par exemple dans la demande de  
15 brevet WO 97/27332. La sonde sera construite par exemple de telle manière que la position de la mutation à mettre en évidence soit sensiblement au centre de la sonde.

Les oligonucléotides utilisés comme amorces ou sondes peuvent comporter des nucléotides naturels ou modifiés comme les phosphorothioates, les H-phosphonates, les alkylphosphorothioates, ou des analogues de nucléotides contenant des bases comme  
20 l'inosine ou la nébularine à la place des bases puriques ou pyrimidiques présentes dans les nucléotides A, T, C, G, U.

Ces amorces ou sondes peuvent aussi être composées totalement ou partiellement de nucléosides d'anométrie alpha ou bêta ou d'isomères de la série D ou L, ou encore de PNA (Nielsen et al, Nucleic Acid Research, 21(2), pp. 197-200, 1993).

25 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, on recherche la ou les mutations par séquençage de tout ou partie du gène de la protéase.

Les différentes méthodes de séquençage sont bien connues : on peut utiliser notamment les méthodes de séquençage de Sanger, les méthodes de séquençage utilisant 4 puits pour la réaction des séquences étudiées avec des amorces de séquençage  
30 marquées par 4 fluorophores différents (Procédure « ABI Prism Dye Primer » de Perkin Elmer), ou le procédé décrit dans le brevet US 5795722 (Visible Genetics), ou bien la méthode utilisant non pas des amorces marquées mais des nucléotides marqués

(procédure « ABI Prism Dye Terminator », Perkin Elmer). Les méthodes de séquençage sont décrites, par exemple, dans Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapitre 13.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, on recherche  
5 uniquement la présence d'une ou plusieurs mutations données. Dans un autre mode de réalisation de l'invention, on recherche à la fois la séquence nucléotidique mutée et la séquence nucléotidique sauvage (non mutée). Dans le cas où l'on met en œuvre une méthode d'hybridation, on définit donc pour chaque position susceptible de muter au moins deux types de sondes : un type de sondes spécifique de la séquence mutée et un  
10 type de sondes spécifique de la séquence sauvage. L'utilisation de ces deux types de sondes permet de contrôler la méthode, puisque l'un au moins des deux types de sondes doit réagir. Un autre avantage est de mettre en évidence, le cas échéant, la présence à la fois de souches mutées et de souches sauvages chez un patient.

De préférence, l'acide nucléique cible est soumis à une réaction préliminaire  
15 d'amplification enzymatique pour augmenter la sensibilité du test, mais il est envisageable de détecter directement l'acide nucléique cible. Les articles de Lewis (1992. Genetic Engineering News, 12, 1-9) d'une part, et d'Abramson et Myers (1993. Curr. Opin. Biotechnol., 4, 41-47), d'autre part, donnent des exemples d'amplification de cible. La technique d'amplification enzymatique est par exemple choisie parmi les  
20 techniques NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), TMA (Transcription Mediated Amplification), RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction), SDA (Strand Displacement Amplification) ou LCR (Ligase Chain Reaction).

La recherche des souches virales mutantes est effectuée à partir d'un  
25 échantillon biologique éventuellement prétraité. Par "prétraitement", on entend les différentes étapes de traitement de l'échantillon pour rendre accessible l'acide nucléique cible, c'est-à-dire le gène de la protéase, comme par exemple, la lyse, la fluidification, la concentration, la capture (voir par exemple US 5 750 338 et US 5 766 849) selon les méthodes connues en soi.

30 Pour extraire l'ARN viral, on peut utiliser par exemple le réactif vendu par la société Boeringher Mannheim (High Pure Viral RNA référence 1858882) ou le kit Quiagen (Viral RNA référence 29504). D'autres procédures sont décrites dans Maniatis

et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2<sup>e</sup> Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. L'échantillon biologique peut être un prélèvement quelconque du corps humain ou éventuellement un prélèvement enrichi par culture, comme par exemple, le sang, le sperme, un tissu cutané, un lavage broncho-alvéolaire, une biopsie, l'urine, des colonies, une culture liquide, etc.

Les exemples suivants illustrent l'invention.

### **EXEMPLES**

#### **EXEMPLE 1**

Une étude a porté sur trois patients contaminés par le VIH-2. Les patients 1 et 2 n'avaient jamais reçu d'anti-protéases. Le patient 3 avait déjà reçu du Ritonavir pendant 8 mois, et ce traitement avait été arrêté 5 mois avant le début de l'étude. Le premier échantillon étudié a été prélevé avant le début du traitement, chez les patients 1 et 2, et 6 semaines après le début du traitement par Ritonavir chez le patient 3. Chez les patients 1 et 2, des échantillons prélevés respectivement 2 mois et 5 mois après le début du traitement ont été étudiés. Pour le patient 3, deux échantillons (8 mois et 11 mois) ont été analysés. Le traitement était constitué de Ritonavir pour le patient 2 et de Ritonavir/Saquinavir pour les patients 1 et 3, aux doses préconisées.

#### **Méthodes :**

Les plasmas ont été obtenus par centrifugation du sang total à 800xg pendant 10 minutes et clarifiés par une deuxième centrifugation à 3 000 xg pendant 15 minutes.

500 microlitres de plasma pur ont été ajoutés à 1,5 millilitre de culture de lymphocytes frais stimulés par la PHA (10<sup>6</sup> cellules / boîte). La réplication virale dans le surnageant a été suivie deux fois par semaine par la mesure de la concentration d'antigène P 24 de VIH (ELAVIA Ag I, Sanofi Diagnostics Pasteur). Les surnageants positifs ont été stockés à - 80° C. Après ultracentrifugation de 1 millilitre de surnageant (23-500xg pendant 1 heure), l'ARN de VIH-2 a été extrait à l'aide du kit Amplicor HCV Spécimen Préparation (Roche).

Le gène Protéase a été rétrotranscrit à partir de 10 microlitres de la solution d'ARN viral et amplifié avec le kit Titan One Tube RT-PCR (Roche Molecular Diagnostics). La transcription inverse et la première amplification ont été effectuées avec les amorces 3' Prot et 5' RT 3 (voir ci-dessous). La réaction à 50 ° C pendant 30

minutes est suivie d'une étape de dénaturation à 94 ° C pendant 5 minutes puis de 40 cycles (30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 90 secondes à 68° C) et enfin à 68° C pendant 7 minutes. La deuxième étape de la PCR a été effectuée avec 5 microlitres du produit de la première étape avec les amorces 3' RTD et 5' Prot 2.1, avec une  
5 dénaturation de 5 minutes à 94° C, suivie de 30 cycles (30 secondes à 94° C, suivie de 30 cycles à 55 ° C et 30 secondes à 72° C) et enfin 10 minutes à 72° C. La séquence des amorces est la suivante :

3' Prot: CAGGGGCTGACACCAACAGCACCCCC

5' RT 3: CCATTTTTCACAGATCTCTTTAATGCCTC

10 3' RTD: ATGTGGGGGTATTATAAGGATTT

5' Prot 2.1: GAAAGAAGCCCCGCAACTTC

Les produits d'amplification ont été purifiés avec le kit QUIACQUICK PCR purification (Quiagen) et séquencées directement à l'aide des amorces 3 ' RTD et 5 ' Prot 2.1 à l'aide du kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystem).  
15 Ils ont été analysés avec le séquenceur automatique Applied Biosystem 377 et les séquences ont été alignées avec les séquences consensus de VIH-2 (sous-types A et  
**Résultats :**

Avant traitement, aucune mutation n'a été détectée par rapport aux séquences consensus VIH-2 A et B.

20 Après traitement, on a observé les mutations suivantes :

– position 45 : chez les patients 1 et 2, on a observé la coexistence d'une population non-mutée (lysine ; codon AAA) et d'une population mutée (arginine ; codon AGA), c'est-à-dire la mutation K45K/R ;

– position 54 : on a observé chez les patients 1 et 2, le remplacement de  
25 l'isoleucine (codon ATA) par la méthionine (codon ATG) : soit la mutation I54M ;

– position 64 : on a observé une population non mutée et une population dans laquelle l'isoleucine (codon ATA) est remplacée par une valine (codon GTA) : soit la mutation I64I/V ;

– position 84 : chez le patient 3 on a observé une population non mutée  
30 (isoleucine ; codon ATC) et une population mutée avec remplacement de l'isoleucine par une leucine (codon CTC) : soit la mutation I84I/L ;

– position 90 : chez les 3 patients, on a observé le remplacement de la

leucine (codon CTG) par une méthionine (codon ATG) : soit la mutation L90M.

De façon analogue, on a observé les mutations suivantes :

- position 10 : le remplacement de la valine (codon : GTA) par une isoleucine (codon : ATA) : soit la mutation V 10 I, lors du traitement d'un patient par du

5 Ritonavir ;

- position 46 : le remplacement de l'isoleucine (codon : ATA) par une valine (codon : GTA) : soit la mutation I 46 V, lors du traitement d'un patient par du Ritonavir ; et

- position 82 : le remplacement de l'isoleucine (codon : ATA) par une  
10 méthionine (codon : ATG) : soit la mutation I 82 M, lors du traitement d'un patient par de l'Indinavir.

**EXEMPLE 2 : Exemple de sondes utilisables pour détecter les mutations sur le gène de la protéase de VIH-2**

Les sondes utilisables pour rechercher l'existence éventuelle de mutations,  
15 conformément à l'invention, selon les techniques d'hybridation, peuvent être définies à partir des alignements publiés par Myers G et al., 1997, Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and aminoacid sequences, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos ; New Mexico.

Bien entendu, outre les sondes définies expressément ci-dessous, l'invention  
20 comprend également les sondes nucléotidiques équivalentes, c'est-à-dire des sondes permettant de détecter les mêmes mutations, sur la séquence protéique de la protéase que celles détectées par les sondes définies ci-dessous, en tenant compte de la dégénérescence du code génétique, autrement dit en tenant compte du fait qu'un même acide aminé peut être codé par différents codons.

25 On entend donc par l'expression "séquences nucléotidiques équivalentes", toutes séquences nucléotidiques différant entre elles par au moins un nucléotide mais dont la traduction conduit à la même séquence protéique, en d'autres termes toutes les séquences nucléotidiques codant pour la même séquence protéique.

Evidemment, cette remarque est valable pour chacun des codons de chacune  
30 des sondes. Ainsi, par exemple l'acide aminé en position 53 de la protéase de HIV- 2 est une phénylalanine qui peut être codée soit par le codon TTT soit par le codon TTC. Les sondes correspondant à chacune de ces possibilités font bien entendu partie de

l'invention.

En fonction des conditions particulières de l'hybridation, et notamment de la température et de la composition des tampons d'hybridation et de lavage, il est possible de définir des sondes qui devront comprendre au moins l'une des séquences minimums  
5 ci-dessous, ou leurs complémentaires. Des sondes contenant ces séquences permettent de discriminer les mutations dans un procédé d'hybridation. Bien entendu, des sondes analogues, obtenues notamment en introduisant des analogues de base, tels que l'inosine ou la nébularine, en des positions où un polymorphisme dû à une variabilité intrinsèque du virus est présent, permettent d'obtenir un résultat similaire et font aussi partie de  
10 l'invention.

Ces séquences sont données dans le sens 5' vers 3' :

- CCA AAA ATA pour une forme sauvage de la position 45.
- CCA AAA GTA pour une forme sauvage de la position 45.
- CCT AAA ATA pour une forme sauvage de la position 45.
- 15 CCA AGA ATA pour une forme mutée de la position 45.
- CCA AGA GTA pour une forme mutée de la position 45.
- CCT AGA ATA pour une forme mutée de la position 45.
- TTT ATA AAC pour une forme sauvage de la position 54.
- TTT ATA AAT pour une forme sauvage de la position 54.
- 20 TTT ATG AAC pour une forme mutée de la position 54.
- TTT ATG AAT pour une forme mutée de la position 54.
- GAA ATA AAA pour une forme sauvage de la position 64.
- GAA ATA GAA pour une forme sauvage de la position 64.
- GAA GTA AAA pour une forme mutée de la position 64.
- 25 GAA GTA GAA pour une forme mutée de la position 64.
- AAC ATC TTT pour une forme sauvage de la position 84.
- AAC ATT TTT pour une forme sauvage de la position 84.
- AAC CTC TTT pour une forme mutée de la position 84.
- ATT CTG ACA pour une forme sauvage de la position 90.
- 30 ATC CTG ACA pour une forme sauvage de la position 90.



ATT CTA ACA pour une forme sauvage de la position 90.

ATC CTA ACA pour une forme sauvage de la position 90.

ATT ATG ACA pour une forme mutée de la position 90.

ATC ATG ACA pour une forme mutée de la position 90.

5 ou bien encore :

CCA GTA GTC pour une forme sauvage de la position 10.

CCA ATA GTC pour une forme mutée de la position 10.

AAA ATA GTA pour une forme sauvage de la position 46.

AAA GTA GTA pour une forme mutée de la position 46.

10 CCA ATC AAC pour une forme sauvage de la position 82.

CCA ATA AAC pour une forme sauvage de la position 82.

CCA ATG AAC pour une forme mutée de la position 82.

Pour obtenir des sondes plus longues que celles ayant les séquences minimum de 9 nucléotides représentées ci-dessus, on doit bien entendu choisir les  
15 nucléotides supplémentaires de façon à respecter la séquence des régions adjacentes de part et d'autre de la séquence minimum dans le gène de la protéase d'une souche de VIH-2. Ces séquences peuvent être obtenues dans les banques de données.

Par exemple, on peut utiliser les sondes qui sont indiquées ci-après, ou leurs complémentaires.

20 (a) position 45 :

On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté AGA), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

25 ATTACACTCCAAGAATAGTAGGGGG

ATTATAGCCCAAGAATAGTAGGGGG

ATTATAGTCCAAGAATAGTAGGGGG

ATTATACCCCAAGAATAGTAGGGGG

ATTATAGTCCAAGAATAGTAGGAGG

ATTATACCCCAAGAATAGTAGGAGG

30 (b) position 54 :

On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté ATG), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

5 TAGGGGGATTTATGAACACCAAAGA  
TAGGGGGATTCATGAACACCAAAGA  
TAGGAGGATTCATGAACACCAAAGA  
TAGGAGGGTTCATGAACACCAAAGA

(c) position 64 :

10 On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté GTA), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

AAAATGTAGAAGTAAAAGTACTAAA  
AAAATATAGAAGTAAAAGTACTAAA  
AAGATGTAGAAGTAAAGGTTACTAAA  
15 AAAATGTAGAAGTAGAAGTTCTAAA  
AAAATGTAGAAGTAGAAGTCCTGGA  
AAAGTGTAGAAGTAAGAGTGCTAAA

(d) position 84 :

20 On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté CTC), dont la séquence est incluse dans la séquence suivante :

CCCCAATCAACCTCTTTGGCAGAAA

(e) position 90 :

25 On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté ATG), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

GCAGAAATATTATGACAGCCTTAGG  
GCAGAAATATTATGGCAACCTTAGG  
GCAGAAATGTTATGACAGCTTTAGG  
30 GCAGAAATATCATGACAGCCTTGGG  
GCAGAAACATTATGACAGCCTTA

On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté ATG), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

5 TAGGGGGATTTATGAACACCAAAGA  
TAGGGGGATTCATGAACACCAAAGA  
TAGGAGGATTCATGAACACCAAAGA  
TAGGAGGGTTCATGAACACCAAAGA

(c) position 64 :

10 On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté GTA), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

AAAATGTAGAAGTAAAAGTACTAAA  
AAAATATAGAAGTAAAAGTACTAAA  
AAGATGTAGAAGTAAAGGTTACTAAA  
15 AAAATGTAGAAGTAGAAGTTCTAAA  
AAAATGTAGAAGTAGAAGTCCTGGA  
AAAGTGTAGAAGTAAGAGTGCTAAA

(d) position 84 :

20 On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté CTC), dont la séquence est incluse dans la séquence suivante :

CCCCAATCAACCTCTTTGGCAGAAA

(e) position 90 :

25 On peut utiliser une sonde comportant par exemple 9 à 25 nucléotides (de préférence répartis symétriquement autour du codon muté ATG), dont la séquence est incluse dans l'une des séquences suivantes :

GCAGAAATATTATGACAGCCTTAGG  
GCAGAAATATTATGGCAACCTTAGG  
GCAGAAATGTTATGACAGCTTTAGG  
30 GCAGAAATATCATGACAGCCTTGGG  
GCAGAAACATTATGACAGCCTTA

### **REVENDICATIONS**

1. Procédé de recherche, dans un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2 contenant au moins une souche virale de VIH-2, d'une résistance éventuelle de ladite souche virale VIH-2 à un traitement par un agent anti-protéase, dans lequel on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation à l'une des positions 45, 54, 64, 84 et 90 de la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, ladite mutation ayant été préalablement reconnue comme induisant ladite résistance, et dans lequel on conclut, dans le cas où une telle mutation a été trouvée, à la présence d'une souche virale résistante audit agent anti-protéase chez le patient considéré.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel :
  - a) on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation à l'une desdites positions de la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale provenant d'un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2,
  - b) on sélectionne, parmi les mutations trouvées en a), celles qui, après clonage dans un virus VIH-2, n'empêchent pas le clone viral obtenu de se multiplier en culture en présence dudit agent anti-protéase, et
  - c) dans le cas où au moins une mutation est sélectionnée à l'étape b), on conclut à l'existence d'une résistance audit agent anti-protéase mentionné en b).
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on recherche la présence d'au moins une mutation choisie parmi les mutations suivantes :

K 45 R, I 54 M, I 64 V, I 84 L, L 90 M,

 dans la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, et dans lequel on conclut à la présence de ladite résistance en cas de présence de ladite mutation ou desdites mutations.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel pour rechercher une mutation de la séquence protéique de la protéase, on effectue la recherche d'une mutation correspondante sur la séquence nucléotidique du gène de ladite protéase.
5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques d'hybridation, selon les méthodes connues.

6. Procédé selon la revendication 4, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques de séquençage, selon les méthodes connues.

7. Sonde nucléotidique utilisable dans le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant comme séquence minimum une séquence choisie dans le groupe constitué par:

(a) CCA AGA ATA pour une forme mutée de la position 45,  
CCA AGA GTA pour une forme mutée de la position 45,  
CCT AGA ATA pour une forme mutée de la position 45,  
TTT ATG AAC pour une forme mutée de la position 54,  
TTT ATG AAT pour une forme mutée de la position 54,  
GAA GTA AAA pour une forme mutée de la position 64,  
GAA GTA GAA pour une forme mutée de la position 64,  
AAC CTC TTT pour une forme mutée de la position 84,  
ATT ATG ACA pour une forme mutée de la position 90,  
ATC ATG ACA pour une forme mutée de la position 90,  
éventuellement complétée par la séquence nucléotidique d'une région adjacente du gène de ladite protéase, de part et d'autre de la séquence minimum,

(b) une séquence nucléotidique équivalente à une séquence définie en (a),  
et

(c) une séquence complémentaire d'une séquence définie en (a) ou en (b).

8. Procédé de recherche, dans un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2 contenant au moins une souche virale de VIH-2, d'une résistance éventuelle de ladite souche virale VIH-2 à un traitement par un agent anti-protéase, dans lequel on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation en position 10 ou 46 de la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, ladite mutation ayant été préalablement reconnue comme induisant ladite résistance, et dans lequel on conclut, dans le cas où telle mutation a été trouvée, à la présence d'une souche virale résistante audit agent anti-protéase chez le patient considéré.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel :

a) on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation à l'une desdites positions de la séquence protéique de la protéase de ladite

souche virale provenant d'un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2,

5 b) on sélectionne, parmi les mutations trouvées en a), celles qui, après clonage dans un virus VIH-2, n'empêchent pas le clone viral obtenu de se multiplier en culture en présence dudit agent anti-protéase, et

c) dans le cas où au moins une mutation est sélectionnée à l'étape b), on conclut à l'existence d'une résistance audit agent anti-protéase mentionné en b).

10 10. Procédé selon la revendication 8, dans lequel on recherche la présence d'au moins une mutation choisie parmi les mutations suivantes :

V 10 I, I 46 V et I 82 M

dans la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, et dans lequel on conclut à la présence de ladite résistance en cas de présence de ladite mutation ou desdites mutations.

15 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, dans lequel pour rechercher une mutation de la séquence protéique de la protéase, on effectue la recherche d'une mutation correspondante sur la séquence nucléotidique du gène de ladite protéase.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques de séquençage, selon les méthodes connues.

20 13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques d'hybridation, selon les méthodes connues.

14. Sonde nucléotidique utilisable dans le procédé de la revendication 13, comprenant comme séquence minimum une séquence choisie dans le groupe constitué par :

25 (a) CCA ATA GTC pour une forme mutée de la position 10,  
AAA GTA GTA pour une forme mutée de la position 46,  
CCA ATG AAC pour une forme mutée de la position 82,  
éventuellement complétée par la séquence nucléotidique d'une région adjacente du gène de ladite protéase, de part et d'autre de la séquence minimum,

30 (b) une séquence nucléotidique équivalente à celle définie en (a), et  
(c) une séquence complémentaire d'une séquence en (a) ou en (b).

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

REC'D 14 SEP 2001

WIPO PCT

Référence du dossier du déposant ou du mandataire DC/AMB BR3208/62980	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01728	Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 21/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12Q1/70		
Déposant BIO MERIEUX et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.



2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

- ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 2 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 05/01/2001	Date d'achèvement du présent rapport 11.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Favre, N N° de téléphone +49 89 2399 7363 

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01728

## I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-15                      version initiale

### Revendications, N°:

1-5                      version initiale

6-14                      reçue(s) le                      03/08/2001    avec la lettre du                      31/07/2001

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description,                      pages :



**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01728

- ☐ des revendications, n°s :  
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

**1. Déclaration**

Nouveauté	Oui : Revendications 1-14
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-14
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-14
	Non : Revendications

- 2. Citations et explications**  
**voir feuille séparée**

**VII. Irrégularités dans la demande internationale**

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :  
**voir feuille séparée**

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 WO 96/08580
- D2 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **42**(12), Dec. 1998, 3256-3265
- D3 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **40**(11), Nov. 1996, 2535-2541
- D4 Journal of Virology, **69**(9), Sept. 1995, 5431-5436
- D5 WO 90/14842, et
- D6 Journal of Biological Chemistry, **268**(15), Jun. 1993, 11939-11945 (ce document a été cité par le demandeur)

2. D1 décrit un procédé de détermination, dans un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-1, d'une résistance éventuelle de la souche virale VIH-1 à un traitement par un agent anti-protéase, dans lequel on recherche la présence d'au moins une position dans la séquence peptidique liée à la résistance (D1, revendications). D1 mentionne deux mutations qui sont particulièrement efficaces en induisant la résistance, K55N et L90M (D1, p. 45, ligne. 16-19).

2.1 Des procédés similaires sont décrits dans D2-D4:

D2 se réfère à la détection et l'identification de mutations dans la séquence protéique de la protéase VIH-1 qui sont liées à une résistance augmentée à l'agent anti-protéase indinavir. Les mutations les plus importantes se trouvent aux positions 63, 84, 90 et concernent les substitutions L63P, I84V, L90M (abrégé de D2).

D3 décrit un procédé de détection de mutations dans la protéase de VIH-1 liées à une résistance aux inhibiteurs de la protéase. Le procédé s'applique aux échantillons sanguins et les mutations concernent les positions 10, 46, 48, 63, 82,

84 et 90 (abrégé et résultats).

D4 décrit les mutations dans les positions 48 et 90 de la protéase de VIH-1 qui augmentent la résistance à l'agent anti-protéase Ro 31-8959 (abrégé).

- 2.2 Les procédés selon les revendications indépendantes 1 et 8 diffèrent du procédé connu des documents D1-D4 en ce que la souche VIH-1 est remplacée par la souche VIH-2.

L'objet des revendications indépendantes 1 et 8 est donc nouveau (article 33(2) PCT).

- 2.3 Le document D5 décrit un vaccin contre le VIH qui contient une protéine modifiée du VIH-2. Entre autres, D5 divulgue une séquence d'acides nucléiques comprenant la séquence CCA AGA ATA et utilisable dans le procédé de la demande (D5, p. 7, ligne 4 et p. 18, ligne 3). Cependant, la-dite séquence comprend plus de 40 nucléotides. Par ailleurs, aucun des documents de l'art antérieur cités ne décrit les autres sondes définies par les revendications indépendantes 7 et 14. L'objet de ces revendications est donc aussi nouveau (article 33(2) PCT).

3. Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme étant la mise à disposition d'un procédé et de sondes nucléotidiques pour identifier des mutations rendant les protéases de la souche VIH-2 résistantes aux agents anti-protéase.

- 3.1 A l'époque de l'invention, la personne du métier connaissait la séquence d'acides aminés de la protéase du VIH-2 (comme indiqué à la page 2 de la demande). De plus, le fait que les séquences des protéases des souches VIH-1 et VIH-2 étaient relativement conservées lui était familier.

Il semblerait, de prime abord, donc évident pour la personne du métier de suivre le procédé des documents D1-D4 et, grâce à la conservation entre VIH-1 et VIH-2, de diagnostiquer des mutations dans des positions connues, c'est-à-dire, les positions 10, 46, 48, 55, 63, 82, 84 et 90, d'obtenant ainsi un procédé et des

sondes nucléotidiques selon les revendications 1, 7, 8 et 14.

Cependant, comme illustré par le document D6 (résumé), il était aussi connu que des différences même apparemment mineures entre les deux souches VIH-1 et VIH-2 pouvaient entraîner des différences majeures. A savoir, la mutation d'un seul acide aminé n'entraîna pas la résistance prédite mais augmenta la sensibilité à une protéase d'un facteur 100.

- 3.2 Au vu de ces faits, l'homme du métier ne pouvait donc pas anticiper l'invention en instance telle que définie par les revendications indépendantes 1, 7, 8 et 14 et par les revendications dépendantes 2-6 et 9-13.

L'objet des revendications 1-14 est donc inventif (article 33(3) PCT).

### **Concernant le point VII**

#### **Irrégularités dans la demande internationale**

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1-D5 et ne cite pas ces documents.

6. Procédé selon la revendication 4, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques de séquençage, selon les méthodes connues.

7. Sonde nucléotidique utilisable dans le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 5, comprenant comme séquence minimum une séquence choisie dans le groupe constitué par: -

(a) CCA AGA ATA pour une forme mutée de la position 45,  
CCA AGA GTA pour une forme mutée de la position 45,  
CCT AGA ATA pour une forme mutée de la position 45,  
TTT ATG AAC pour une forme mutée de la position 54,  
TTT ATG AAT pour une forme mutée de la position 54,  
GAA GTA AAA pour une forme mutée de la position 64,  
GAA GTA GAA pour une forme mutée de la position 64,  
AAC CTC TTT pour une forme mutée de la position 84,  
ATT ATG ACA pour une forme mutée de la position 90,  
ATC ATG ACA pour une forme mutée de la position 90,  
éventuellement complétée par la séquence nucléotidique d'une région adjacente du gène de ladite protéase, de part et d'autre de la séquence minimum,

(b) une séquence nucléotidique équivalente à une séquence définie en (a),  
et

(c) une séquence complémentaire d'une séquence définie en (a) ou en (b),  
ladite sonde ayant au plus 40 nucléotides.

8. Procédé de recherche, dans un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2 contenant au moins une souche virale de VIH-2, d'une résistance éventuelle de ladite souche virale VIH-2 à un traitement par un agent anti-protéase, dans lequel on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation en position 10 ou 46 de la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, ladite mutation ayant été préalablement reconnue comme induisant ladite résistance, et dans lequel on conclut, dans le cas où telle mutation a été trouvée, à la présence d'une souche virale résistante audit agent anti-protéase chez le patient considéré.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel :

a) on recherche, selon les méthodes connues, la présence d'au moins une mutation à l'une desdites positions de la séquence protéique de la protéase de ladite

souche virale provenant d'un échantillon biologique prélevé sur un patient contaminé par VIH-2,

b) on sélectionne, parmi les mutations trouvées en a), celles qui, après clonage dans un virus VIH-2, n'empêchent pas le clone viral obtenu de se multiplier en culture en présence dudit agent anti-protéase, et

c) dans le cas où au moins une mutation est sélectionnée à l'étape b), on conclut à l'existence d'une résistance audit agent anti-protéase mentionné en b).

10. Procédé selon la revendication 8, dans lequel on recherche la présence d'au moins une mutation choisie parmi les mutations suivantes :

10 V 10 I, I 46 V et I 82 M

dans la séquence protéique de la protéase de ladite souche virale, et dans lequel on conclut à la présence de ladite résistance en cas de présence de ladite mutation ou desdites mutations.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, dans lequel pour rechercher une mutation de la séquence protéique de la protéase, on effectue la recherche d'une mutation correspondante sur la séquence nucléotidique du gène de ladite protéase.

12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques de séquençage, selon les méthodes connues.

13. Procédé selon la revendication 11, dans lequel on effectue ladite recherche à l'aide des techniques d'hybridation, selon les méthodes connues.

14. Sonde nucléotidique utilisable dans le procédé de la revendication 13, comprenant comme séquence minimum une séquence choisie dans le groupe constitué par :

25 (a) CCA ATA GTC pour une forme mutée de la position 10,  
AAA GTA GTA pour une forme mutée de la position 46,  
CCA ATG AAC pour une forme mutée de la position 82,

éventuellement complétée par la séquence nucléotidique d'une région adjacente du gène de ladite protéase, de part et d'autre de la séquence minimum,

30 (b) une séquence nucléotidique équivalente à celle définie en (a), et

(c) une séquence complémentaire d'une séquence définie en (a) ou en (b),  
ladite sonde ayant au plus 40 nucléotides.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr Application No

PCT/FR 00/01728

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, STRAND, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 08580 A (SEPRACOR INC ;HEEFNER DONALD L (US); MELNICK LAURENCE M (US)) 21 March 1996 (1996-03-21) * see especially page 45, lines 16-19 * the whole document	1-6,8-13
X	MELNICK L ET AL.: "An Escherichia coli expression assay andscreen for immunodeficiency virus protease variants with decreased susceptibility to indinavir" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 42, no. 12, 1998, pages 3256-3265, XP000901687 the whole document	1-5, 8-11,13
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 December 2000

Date of mailing of the international search report

11/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 00/01728

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	VASUDEVACHARI M B ET AL.: "Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 11, 1996, pages 2535-2541, XP000901688 the whole document	1-6,8-13
Y	US 5 436 131 A (CONDRA JON H ET AL) 25 July 1995 (1995-07-25) abstract; claim 1; examples 3-5	1-6,8-13
A	WO 90 14842 A (MEDICAL RES COUNCIL ;UNIV READING (GB)) 13 December 1990 (1990-12-13) abstract page 7, line 4 page 18, line 3	7
A	MASCHERA B ET AL.: "Analysis of resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by using matched bacterial expression and proviral infection vectors" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 9, 1995, pages 5431-5436, XP002137320 the whole document	
A	MARTINEZ-PICADO ET AL.: "Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1" JOURNAL OF VIROLOGY,US,THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 73, no. 5, May 1999 (1999-05), pages 3744-3752, XP002126128 ISSN: 0022-538X the whole document	
P,Y	WO 99 67428 A (INNOGENETICS NV ;STUYVER LIEVEN (BE)) 29 December 1999 (1999-12-29) the whole document	1-5, 8-11,13
P,Y	WO 99 38961 A (SEPRACOR INC) 5 August 1999 (1999-08-05) abstract; claims 1-3	1-5, 8-11,13



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interr

Application No

PCT/FR 00/01728

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9608580	A	21-03-1996	US 6063562 A	16-05-2000
			AU 1953199 A	20-05-1999
			AU 699561 B	10-12-1998
			AU 3635295 A	29-03-1996
			CA 2199805 A	21-03-1996
			EP 0781351 A	02-07-1997
			JP 10506272 T	23-06-1998
			US 5766842 A	16-06-1998
US 5436131	A	25-07-1995	GB 2276621 A	05-10-1994
WO 9014842	A	13-12-1990	CA 2055616 A	01-12-1990
			EP 0475987 A	25-03-1992
WO 9967428	A	29-12-1999	AU 4900199 A	10-01-2000
WO 9938961	A	05-08-1999	AU 2346199 A	16-08-1999
			EP 1051484 A	15-11-2000

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01728

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C12Q1/70

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, STRAND, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 96 08580 A (SEPRACOR INC ;HEEFNER DONALD L (US); MELNICK LAURENCE M (US)) 21 mars 1996 (1996-03-21) voir en particulier page 45, lignes 16-19 le document en entier	1-6,8-13
X	MELNICK L ET AL.: "An Escherichia coli expression assay andscreen for immunodeficiency virus protease variants with decreased susceptibility to indinavir" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 42, no. 12, 1998, pages 3256-3265, XP000901687 le document en entier	1-5, 8-11,13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

11/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Knehr, M

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	VASUDEVACHARI M B ET AL.: "Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection" ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, vol. 40, no. 11, 1996, pages 2535-2541, XP000901688 le document en entier	1-6,8-13
Y	US 5 436 131 A (CONDRA JON H ET AL) 25 juillet 1995 (1995-07-25) abrégé; revendication 1; exemples 3-5	1-6,8-13
A	WO 90 14842 A (MEDICAL RES COUNCIL ;UNIV READING (GB)) 13 décembre 1990 (1990-12-13) abrégé page 7, ligne 4 page 18, ligne 3	7
A	MASCHERA B ET AL.: "Analysis of resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors by using matched bacterial expression and proviral infection vectors" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 9, 1995, pages 5431-5436, XP002137320 le document en entier	
A	MARTINEZ-PICADO ET AL: "Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1" JOURNAL OF VIROLOGY,US,THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 73, no. 5, mai 1999 (1999-05), pages 3744-3752, XP002126128 ISSN: 0022-538X le document en entier	
P,Y	WO 99 67428 A (INNOGENETICS NV ;STUYVER LIEVEN (BE)) 29 décembre 1999 (1999-12-29) le document en entier	1-5, 8-11,13
P,Y	WO 99 38961 A (SEPRACOR INC) 5 août 1999 (1999-08-05) abrégé; revendications 1-3	1-5, 8-11,13

# RAPPORT DE RECHER / INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/01728

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9608580 A	21-03-1996	US 6063562 A AU 1953199 A AU 699561 B AU 3635295 A CA 2199805 A EP 0781351 A JP 10506272 T US 5766842 A	16-05-2000 20-05-1999 10-12-1998 29-03-1996 21-03-1996 02-07-1997 23-06-1998 16-06-1998
US 5436131 A	25-07-1995	GB 2276621 A	05-10-1994
WO 9014842 A	13-12-1990	CA 2055616 A EP 0475987 A	01-12-1990 25-03-1992
WO 9967428 A	29-12-1999	AU 4900199 A	10-01-2000
WO 9938961 A	05-08-1999	AU 2346199 A EP 1051484 A	16-08-1999 15-11-2000